2164

THÈSE

PRESENTEE

AU CENTRE D'ORSAY

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR 3ème Cycle

PAR

Didier HARISTOY

Sujet : Etude par radiolyse gamma et radiolyse pulsée de l'action de l'ion superoxyde sur le système oxyhémoglobine-méthémoglobine.

Soutenue le 5 NOV 1976 **devant la Commission d'examen**

M. M. LEFORT Président.

Mlle C. FERRADINI
M. G. BOUISSIERES } Examinateurs.

E R R A T A
==========

page 11 NaOH : 0,044 M

page 28,29 : A en ordonnée

page 43 : Référence 21 (1970).

THÈSE

PRESENTEE

AU CENTRE D'ORSAY

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR 3ème Cycle

PAR

Didier HARISTOY

Sujet : Etude par radiolyse gamma et radiolyse pulsée de l'action de l'ion superoxyde sur le système oxyhémoglobine-méthémoglobine.

5 NOV. 1976

Soutenue le **devant la Commission d'examen**

M. M. LEFORT Président.

Mlle C. FERRADINI
M. G. BOUISSIERES } Examinateurs.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Etude par radiolyse gamma et radiolyse pulsée de l'action de l'ion superoxyde sur le système oxyhémoglobine-méthémoglobine.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548118_0030

Que Messieurs les Professeurs M. LEFORT et G. BOUISSIERES qui m'ont permis de poursuivre ces études de Chimie Nucléaire, veuillent bien trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

Le présent travail a été effectué au sein du laboratoire de Chimie-Physique de l'Université René Descartes(Paris V),sous la direction de Mademoiselle C. FERRADINI,Professeur,et de Monsieur J. PUCHEAULT,Maitre de Recherche au C.N.R.S..Leurs conseils et leurs encouragements m'ont aidé à résoudre les divers problèmes avec lesquels j'ai été confronté.Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expession de ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier Monsieur J. FOOS,Maitre Assistant à Paris V,pour l'appui et les conseils qu'il a bien voulu me prodiguer tout au long de ce travail malgré ses occupations universitaires.

Je remercie Messieurs A. ROTH, J. SUTTON,L.GILLES,du Commissariat à l'Energie Atomique,qui ont mis à ma disposition leurs installations lors de mes expériences de radiolyse pulsée.

Je remercie également Monsieur A. FLEURY de l'Université Bordeaux I,qui a bien voulu se charger de me mettre en contact avec Monsieur le Professeur M. LEFORT,alors que je suivais ses cours dans cette même université.

J'exprime ma sympathie et mes remerciements à toutes les personnes du laboratoire de Chimie-Physique pour l'aide cordiale qu'elles m'ont toujours apportées.

Je ne saurais oublier de remercier Mademoiselle M. PARE qui a bien voulu se charger du tirage de cette thèse.

CHAPITRE I

I - INTRODUCTION.

De nombreux travaux, tout particulièrement de chimie des radiations, ont permis de caractériser, tant du point de vue cinétique que thermodynamique, les divers intermédiaires impliqués dans la chaîne d'oxydation qui va de l'oxygène à l'hydrogène:

$$O_2 \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} \left\{ \begin{matrix} O_2^- \\ \\ HO_2 \end{matrix} \right\} \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} H_2O_2 \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} OH \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} H_2O \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} \left\{ \begin{matrix} e_{aq} \\ \\ H \end{matrix} \right\} \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} H_2 \quad .$$

Bien que l'on ait pensé que le rôle de diverses enzymes (oxydases et peroxydases) était de court-circuiter certaines étapes, on peut supposer que lors des oxydations biologiques, les espèces radicalaires O_2^- et OH jouent un rôle important. En effet depuis 1969(I), il a été mis en évidence la présence générale, dans plusieurs phénomènes d'oxydations et dans de nombreux sites biologiques, d'enzymes superoxyde dismutases (SOD) dont la fonction est de catalyser la dismutation des ions superoxyde (O_2^-) (2)(3),

$$O_2^- + O_2^- \xrightarrow{2H^+} H_2O_2 + O_2 .$$

Cette présence, au moins dans les organismes aérobies,

montre l'importance biologique du radical O_2^-. Il est admis que ces enzymes ont pour but de protéger l'organisme des effets toxiques de cet ion (4-6). Cependant on peut se demander si, parfois, cette espèce n'a pas une action bénéfique en catalysant les oxydations par O_2 : en effet, il est connu que ces oxydations sont difficiles, tant du point de vue thermodynamique (E'_o O_2/O_2^- = -0,44 V à pH 7), que cinétique (O_2 est un biradical qui agit préférentiellement avec des composés possédant des électrons célibataires).

Il est ainsi possible d'imaginer une chaîne d'oxydation par l'oxygène portée par le radical O_2^-, du type :

$$O_2^- + AH_2 \xrightarrow{H^+} AH + H_2O_2 ,$$

$$O_2 + AH \longrightarrow A + O_2^- + H^+ .$$

Ceci suppose que certaines réactions conduisent spécifiquement dans l'organisme, à la présence d'un état stationnaire en ion superoxyde capable d'initier cette chaîne.

Récemment, il a été montré (7-10) que l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine (HbO_2) en méthémoglobine (MetHb), conduisait à la formation de ce radical suivant la réaction :

$$HbO_2 \longrightarrow MetHb + O_2^- .$$

L'existence de cette réaction pourrait donc faire jouer au système le rôle de donneur d'ions O_2^-, en dehors de celui de transporteur d'oxygène, bien connu pour l'hémoglobine.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier le comportement

chimique du radical O_2^- vis à vis du système HbO_2-MetHb.

Les réactions de réduction de la méthémoglobine par les ions O_2^- et d'oxydation de l'oxyhémoglobine sont en effet thermodynamiquement possibles, étant donnés les potentiels d'oxydoréduction (à pH 7, E'_o MetHb/Hb = 0,144 V, E'_o O_2/O_2^- = -0,44 V , E'_o O_2^-/H_2O_2 = 0,89 V).

L'étude de ces réactions peut être menée de façon tout à fait satisfaisante par la radiolyse, soit en élevant par radiolyse γ l'état stationnaire en radical O_2^-, soit en étudiant directement la vitesse de réaction par radiolyse pulsée.

Avant d'examiner les méthodes expérimentales proprement dites il convient de rappeler, d'une part un certain nombre de propriétés du système oxyhémoglobine-méthémoglobine et d'autre part d'indiquer quels sont les principes fondamentaux de la radiolyse qui nous permettront de mener cette étude.

II -HEMOGLOBINE-OXYHEMOGLOBINE-METHEMOGLOBINE.

Dans le groupe des hémoprotéines, la protéine la plus importante pour les animaux supérieurs est l'hémoglobine (Hb) (voir par exemple II). Son importance est liée au fait qu'elle a la propriété de transporter l'oxygène du sang. L'hémoglobine est formée par l'association d'un hème et d'une globine, chaîne peptidique d'acides aminés dont le nombre et la nature diffèrent selon la chaîne. La structure de l'hème est complexe; elle se compose de quatre noyaux pyrroliques. Ces hétérocycles sont unis par l'intermédiaire de groupements méthényles fixés sur les carbones α ; les carbones β étant substitués au total par quatre groupements méthyles, deux groupements vinyles, deux groupements propionyles (fig I). Un ion

ferreux(Fe^{II})est lié aux quatre atomes d'azote des pyrroles formant ainsi un complexe chélaté.Le fer échange aussi une liaison avec le groupement imidazol de l'histidine(voir par exemple I2)(fig 2), premier acide de la chaîne peptidique.Le sixième coordinat de cet ion complexe peut être H_2O(Hémoglobine)(I3),ou O_2(Oxyhémoglobine) (fig 2).

L'étude du mécanisme de fixation de l'oxygène a conduit à considérer la molécule d'hémoglobine(Fe^{II})comme un tétramère, (complexe allostérique)formé de deux sous-unités structurales α et β (I4). Sa masse molaire est comprise entre 65000 et 68000.

Quand l'ion ferreux est oxydé en ion ferrique, l'hémoglobine se transforme en méthémoglobine,elle même tétramérique(I5),qui ne peut plus fixer l'oxygène.Les agents méthémoglobisants sont donc des composés toxiques.Toutefois dans l'organisme,la réduction de la méthémoglobine par le nicotinamide adénine dinucléotide(NADH)est catalysée par la NADH-méthémoglobine-réductase (I6 - I8).Le mécanisme de cette réaction n'est pas bien connu.

Les figures 3 et 4 montrent les spectres d'absorption respectivement de la méthémoglobine et de l'oxyhémoglobine(I9).Ils se caractérisent par une bande (bande de Soret)à 407 nm pour la méthémoglobine et à 415 nm pour l'oxyhémoglobine , qui posséde deux autres pics respectivement à 540 nm et 578 nm.Les points isobestiques se trouvent à 475,525 et 590 nm(20).

Pour ce travail nous prendrons comme convention d'exprimer les molarités en mole d'hème par litre;en effet notre raisonnement porte essentiellement sur la réduction ou l'oxydation des ions ferriques ou ferreux.De même,dans les schémas cinétiques,nous symboliserons l'oxyhémoglobine par: $Fe^{II}O_2$ et la méthémoglobine par: Fe^{III}.

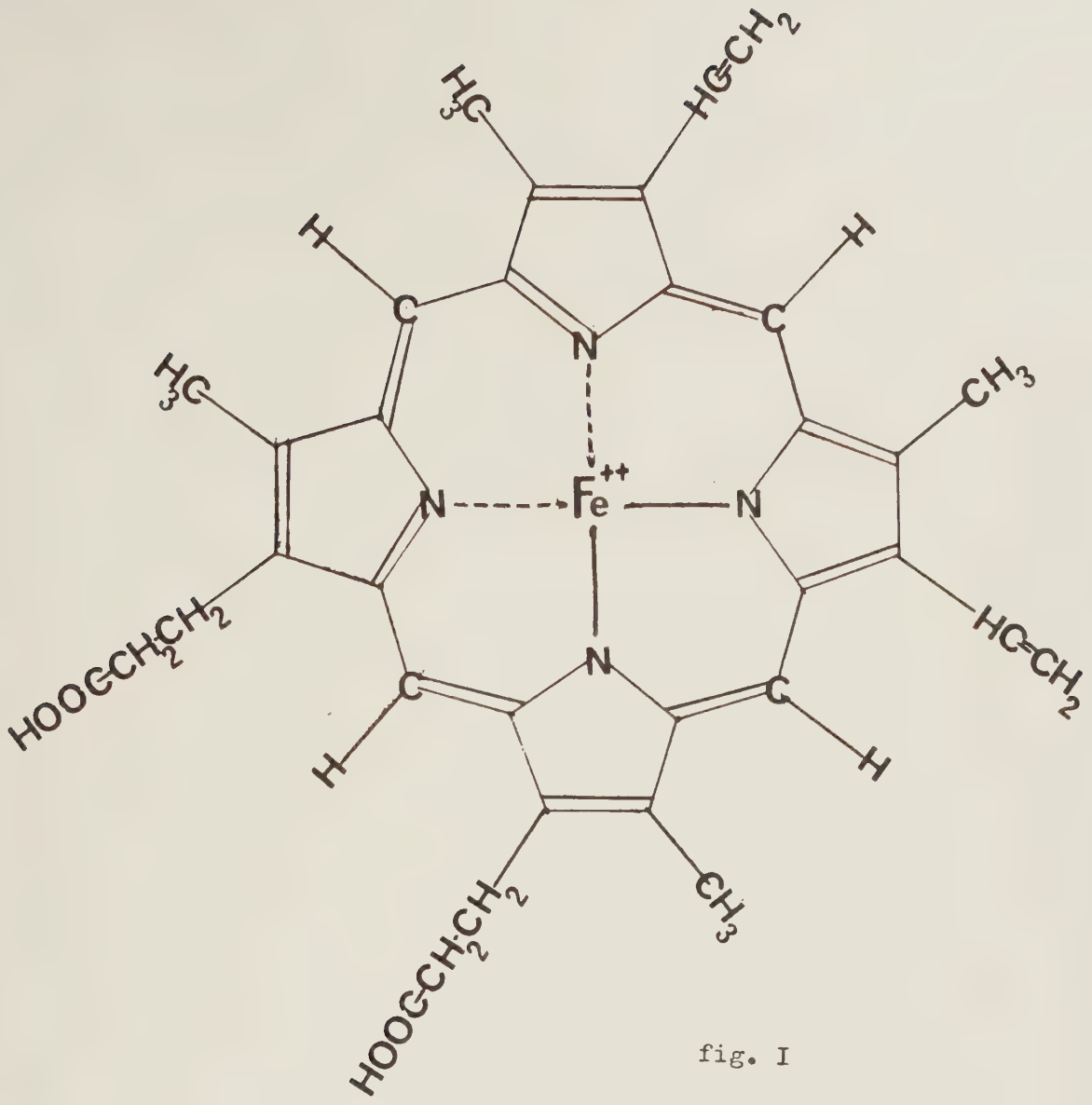


fig. I

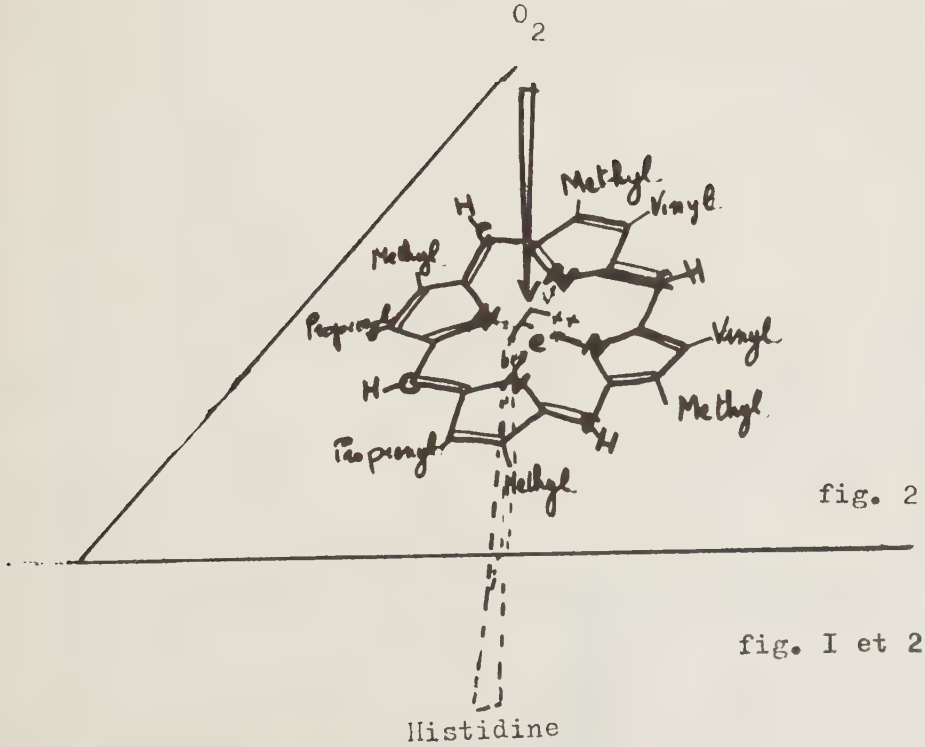


fig. 2

fig. I et 2 Représentation de l'hème.

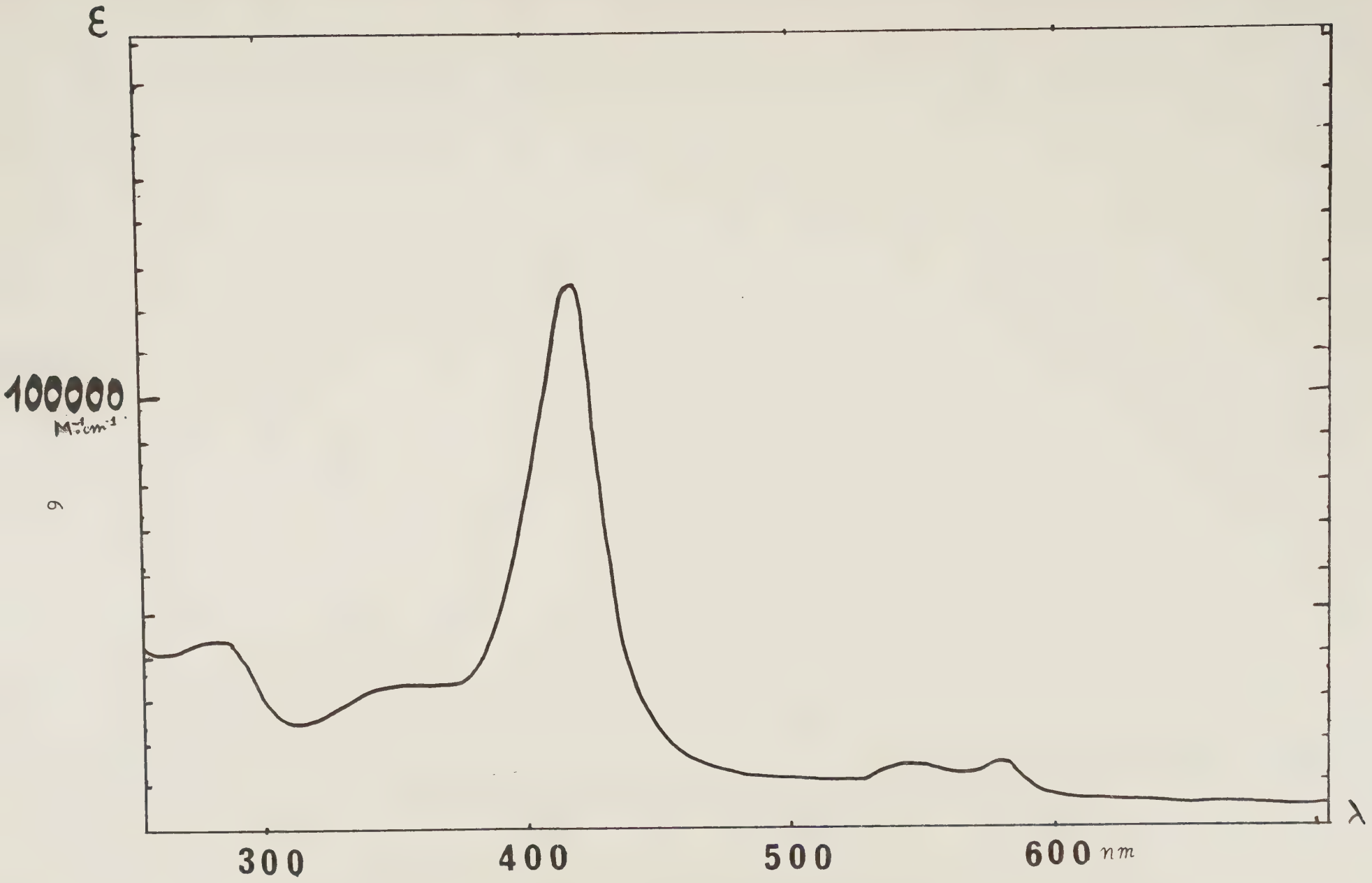


fig. 3 Spectre de l'oxyhémoglobine.

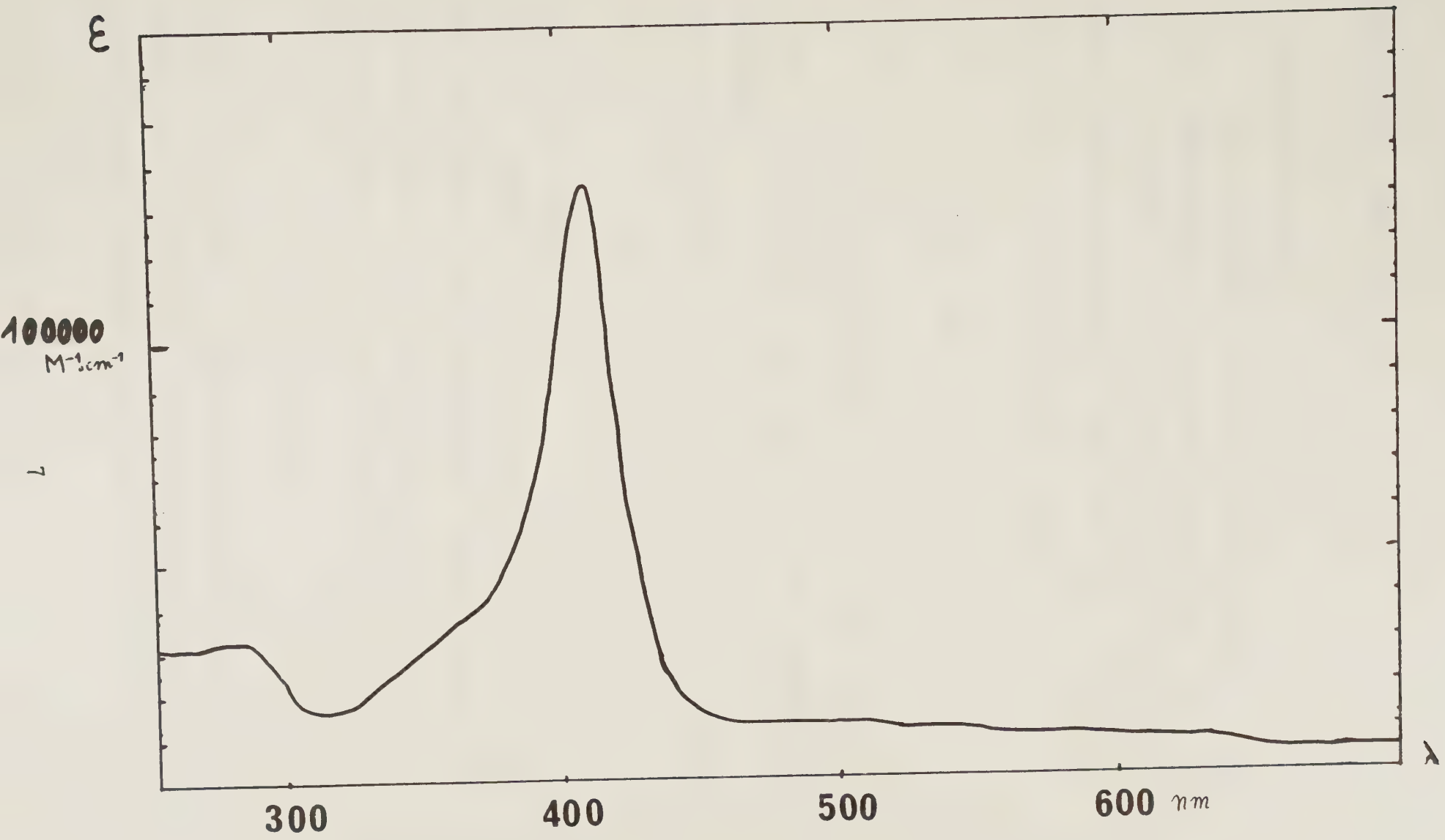
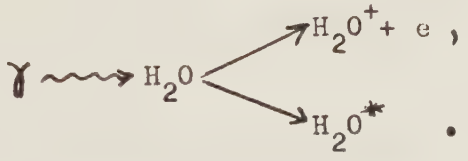


fig. 4 Spectre de la méthémoglobine.

III-RADIOLYSE DE L'EAU.

A)Effets primaires.

L'absorption de l'énergie du rayonnement gamma par l'eau se fait par l'intermédiaire des électrons Compton.Ceux-ci ont le même comportement que des électrons accélérés de même énergie.Chaque électron peut être assimilé à un champ électrostatique mobile.Ce champ crée des ionisations ou des excitations,



L'action directe du rayonnement conduit donc en 10^{-15} seconde à l'apparition de H_2O^+,e,H_2O^*.Ces espèces réagissent rapidement:

—H_2O^+ réagit sur l'eau comme un acide très fort suivant la réaction:

$$H_2O^+ + H_2O \longrightarrow H_3O^+ + OH ,$$

qui se produit en 10^{-14}seconde.

—L'électron cédant au milieu son énergie cinétique se thermalise aprés avoir formé d'autres excitations et ionisations,finalement il oriente dans son champ les molécules d'eau et se solvate. L'électron solvaté est la base conjuguée de l'atome H:

$$H^+ + e_{aq} \longrightarrow H .$$

—H_2O^* se désexcite,soit en rompant homolytiquement une de ses liaisons sous l'effet de son énergie propre en donnant les radicaux H et OH,soit par une série de chocs avec les molécules voisines.

10^{-12} seconde après le passage du rayonnement, il se crée donc des zones hétérogènes où la concentration en radicaux e_{aq}, H et OH est forte sur de courtes distances. Tout en diffusant à partir de ces zones, ces espèces sont donc susceptibles de réagir entre elles:

$$H + H \longrightarrow H_2 ,$$

$$OH + OH \longrightarrow H_2O_2 ,$$

$$e_{aq} + e_{aq} \longrightarrow H_2 + 2\,OH^- ,$$

$$H + OH \longrightarrow H_2O .$$

10^{-9} seconde après le passage des électrons, on se trouve donc en présence des espèces suivantes: H, e_{aq}, OH, H_2, H_2O_2. Celles-ci sont sont alors distribuées de manière homogène dans le milieu et l'ensemble de cette décomposition peut se schématiser par l'équation chimique suivante:

$$G_{-H_2O}\,H_2O \rightsquigarrow G_H\,H + G_{e_{aq}}\,e_{aq} + G_{OH}\,OH + G_{H_2O_2}\,H_2O_2 + G_{H_2}\,H_2 + G_{e_{aq}}\,H^+ ,$$

où G_{-H_2O} désigne le rendement de décomposition de l'eau. G_{-H_2O} est égal au nombre de molécules d'eau transformées pour 100 eV absorbés.

B) Action sur les solutés.

Lorsqu'un soluté S est en concentration suffisante il peut capter toutes les espèces susceptibles de réagir avec lui et le rendement de transformation G(-S) est sensiblement constant en fonction de la concentration. Si la concentration du soluté est insuffisante, les radicaux formés réagissent préférentiellement avec eux-mêmes, ou avec les produits moléculaires présents. Le rendement de transformation en est diminué d'autant (courbe de dilution).

C) Production des ions superoxyde .

Si l'on veut transformer toutes les espèces radicalaires en ions superoxyde avant qu'elles ne réagissent sur un soluté, il est possible d'opérer en présence d'ions formiate (0,16M) (21) en milieu aéré. A un pH voisin de la neutralité, les réactions suivantes ont lieu (22):

$$e_{aq} + O_2 \longrightarrow O_2^- \qquad k=2.10^{10}\ M^{-1}s^{-1}\ (23)(24),$$

$$OH + HCOO^- \longrightarrow H_2O + COO^- \qquad k=2.10^{9}\ M^{-1}s^{-1}\ (25),$$

$$H + HCOO^- \longrightarrow H_2 + COO^- \qquad k=5.10^{8}\ M^{-1}s^{-1}\ (26)(27),$$

$$COO^- + O_2 \longrightarrow CO_2 + O_2^- \qquad k=2,4.10^{9}\ M^{-1}s^{-1}\ (28).$$

Ces réactions conduisent totalement à la formation de l'ion superoxyde. Le rendement de cette formation est voisin de 6 radicaux O_2^- apparus pour 100 eV absorbés.

CHAPITRE II

METHODES EXPERIMENTALES.

I)PREPARATION DES SOLUTIONS DE METHEMOGLOBINE ET D'OXYHEMOGLOBINE.

Les produits minéraux utilisés étaient de qualité "Merck". Afin d'obtenir un pH voisin de 7,8, les solutions étaient tamponnées (solution tampon= NaH_2PO_4,H_2O:5 10^{-2}M;NaOH:0,44M;eau tridistillée). L'hémoglobine et la méthémoglobine étaient préparées par "Sigma" à partir de sang de boeuf.Nous avons constaté que l'hémoglobine fournie contenait une forte proportion de méthémoglobine($\simeq$80%).Il a donc fallu effectuer une réduction pour des concentrations de l'ordre de 10^{-4}Mhème,en ajoutant un excès de dithionite($Na_2S_2O_4$) en poudre (7) (8).Cette préparation était faite sous atmosphère d'azote afin d' éviter une réoxydation par l'oxygène(figures 5 et 6).La solution réduite était alors passée sur une colonne(2,5x20cm)de résine Séphadex G 25 médium(50-150μm)équilibrée avec la solution tampon(29)(30). Ce passage sur résine était nécessaire afin d'éliminer le dithionite en excès(31).L'hémoglobine recueillie à la sortie de la colonne était réoxygénée;l'oxyhémoglobine ainsi obtenue devait être conservée à 4°C sous atmosphère d'azote(32)(33).La solution pouvait ainsi être utilisée pendant une dizaine de jours.Nous avons vérifié que,pour des volumes d'éluant n'excédant pas 75cm^3,le dithionite n'était pas entrainé.Le plus grand soin a été apporté au nettoyage de la verrerie

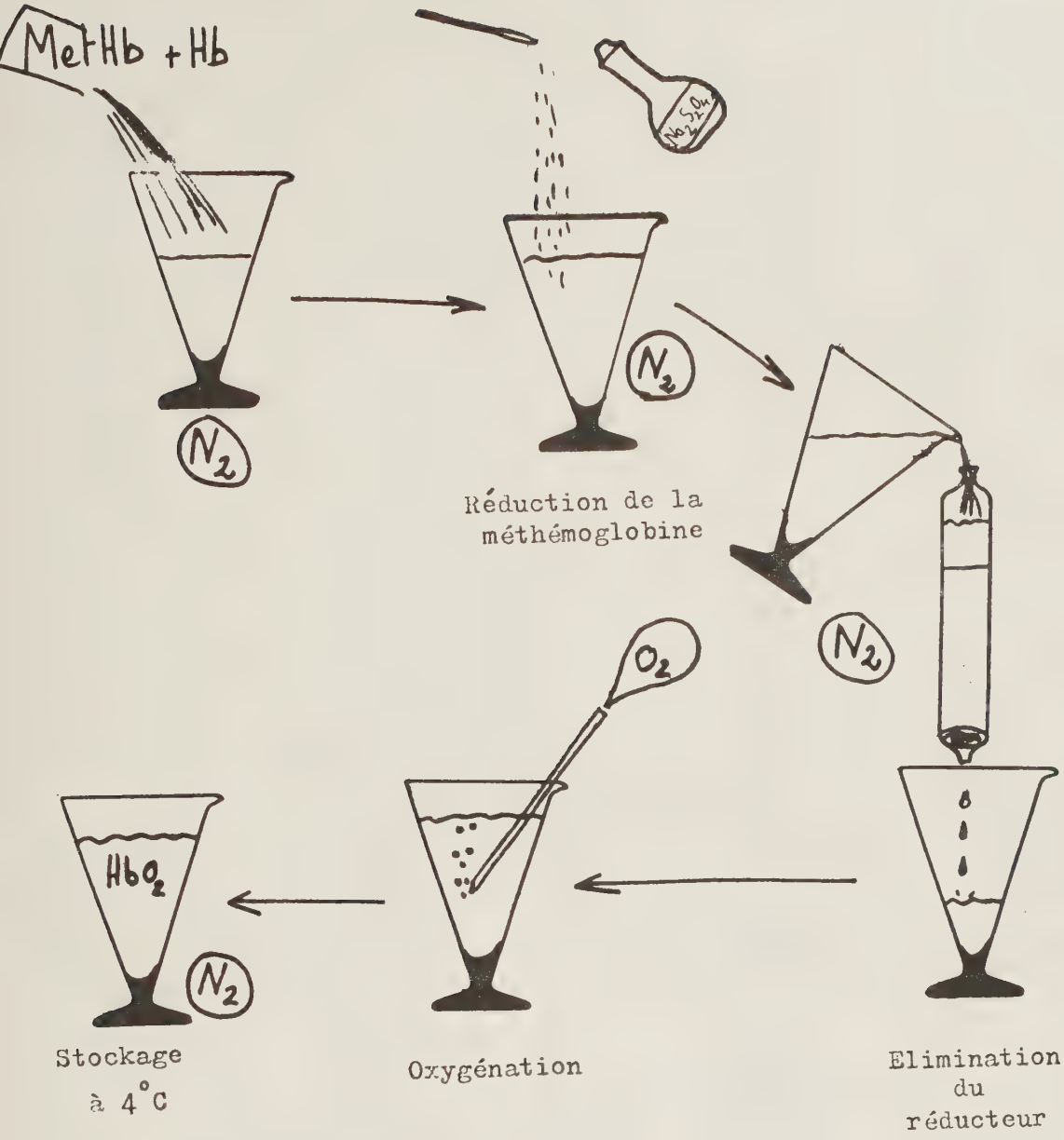


fig. 5 Préparation de l'oxyhémoglobine.

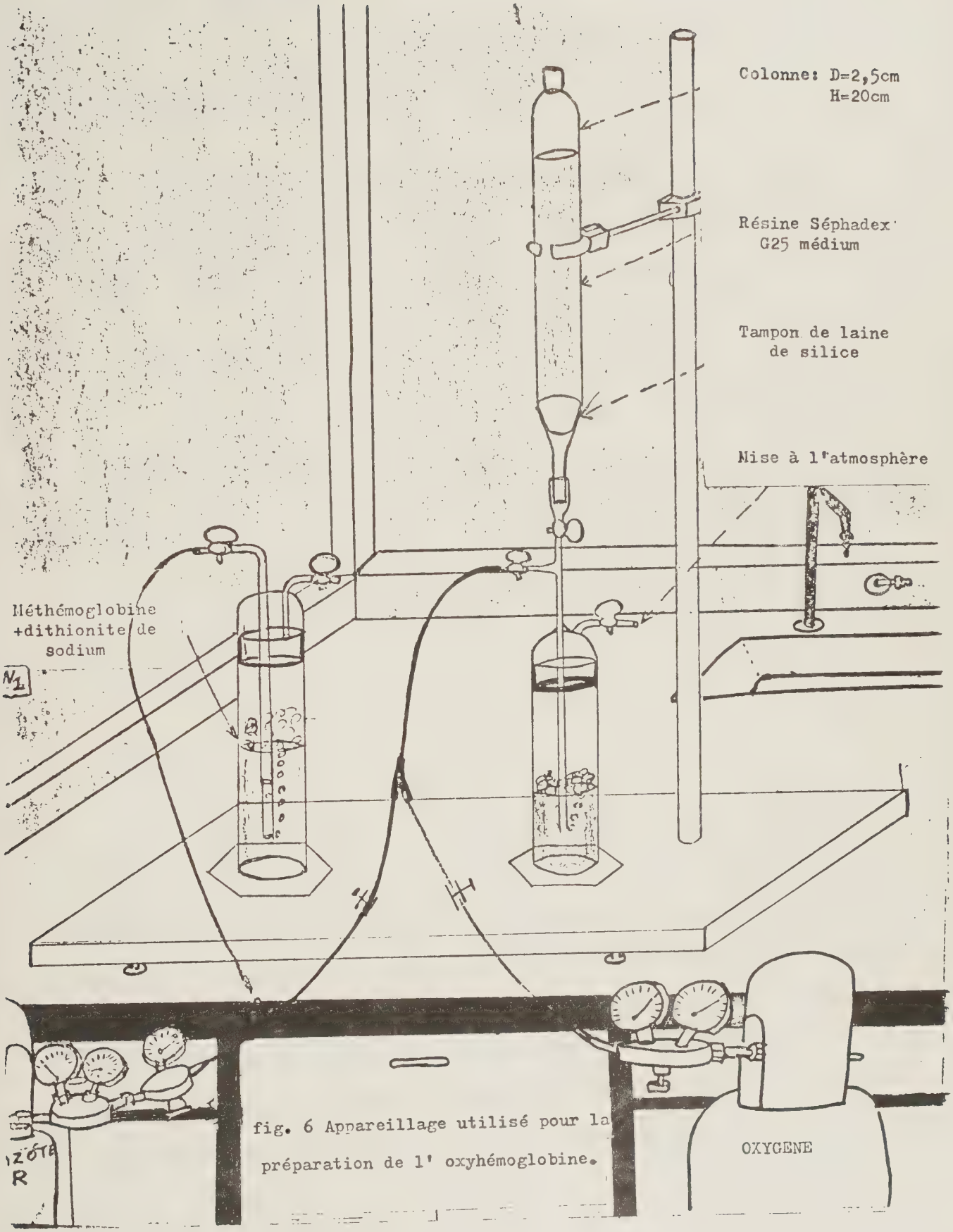


fig. 6 Appareillage utilisé pour la préparation de l' oxyhémoglobine.

afin d'éliminer toute impureté et tout risque de contamination bactériologique des solutions.

II)SOURCES D'IRRADIATION.

Deux types d'irradiation ont été employés pour effectuer ces manipulations,l'un utilisant le rayonnement γ d'un radioélément, l'autre faisant appel à la technique de la radiolyse pulsée.

A)Irradiations γ.

Les solutions ont été irradiées dans un dispositif contenant six sources de cobalt 60 d'une activité totale de 600 Curies.Le débit de dose variait suivant les canaux d'irradiation entre 0,6 et 5,6 $.10^{18}$ $eV.cm^{-3}.h^{-1}$;il a été mesuré à l'aide du dosimètre de Fricke en prenant un rendement:G=I5,6 ions ferriques formés pour I00 eV absorbés. Fe^{3+} apparu a été dosé par spectrophotométrie(λ=304 nm,$\varepsilon_{304\ nm}$= 2090 $M^{-1}.cm^{-1}$ à I9°C).

B)Radiolyse pulsée.

Les expériences de radiolyse pulsée ont été effectuées à l'aide d'un accélérateur d'électrons(Febetron 707)du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay(DRA/SRIR Ma).Le principe de cet accélérateur est basé sur la décharge en série de condensateurs préalablement chargés en parallèle(générateur de Marx).Cette décharge applique rapidement la tension sur la cathode d'un tube à émission de champ.Les électrons émis ont ainsi une énergie d'environ 2 MeV;ils ne sont pas monoénergétiques,mais 90% d'entre eux ont,après déviation magnétique,une énergie

supérieure à 0,9 MeV.La durée moyenne de l'impulsion est alors d'environ I5 ns.La variation des espèces formées en fonction du temps était suivie par spectrophotométrie rapide.Pour cela, le faisceau lumineux produit après absorption dans la cellule d'irradiation passait dans un monochromateur et son intensité était mesurée à l'aide d'un photomultiplicateur dont le signal était enregistré sur un oscilloscope(figure 7).

Pour toutes ces irradiations, nous avons pris soin de travailler à des doses bien inférieures à celles correspondant à la dégradation des hémoprotéines(34,35).

C)Dosage des solutions irradiées.

Les solutions irradiées ont été dosées par spectrophotométrie à 430 nanomètres.Bien que cette longueur d'onde soit dans la descente du pic de Soret(figures 3 et 4),elle se caractérise par une grande différence de valeur entre les coefficients d'extinction molaire comme en témoigne la figure 8.Connaissant les coefficients d'extinction molaire à certaines longueurs d'ondes caractéristiques(36 -39) l'examen du spectre nous a permis de déterminer à 430 nm ces coefficients (Tableaux I et II) donc leur différence:

$$\Delta\varepsilon_{430} = 35000 \text{ Mhème}^{-I}.\text{cm}^{-I} \text{ à } 25°C$$

Cette valeur est en accord avec celle déjà citée,déterminée par Augusto et Cilento(8).

Pour doser les solutions irradiées aux rayons γ ,nous avons utilisé un spectrophotomètre Jobin-Yvon,type Ultraspac.

λ nm	415	430	540	578
25C ε $M^{-1}.cm^{-1}$	125000	67000	15000	15600

Tableau I Coefficients d'extinction molaire de l'oxyhémoglobine.

λ nm	407	430	500	630
25C ε $M^{-1}.cm^{-1}$	134000	32000	9500	3750

Tableau II Coefficients d'extinction molaire de la méthémoglobine.

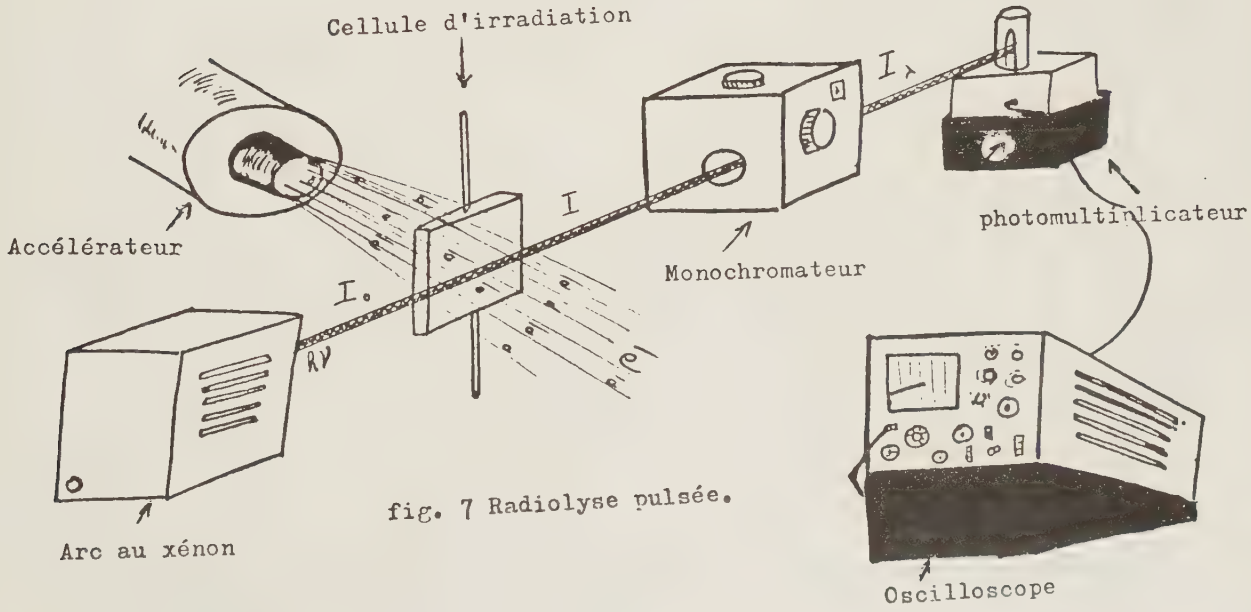


fig. 7 Radiolyse pulsée.

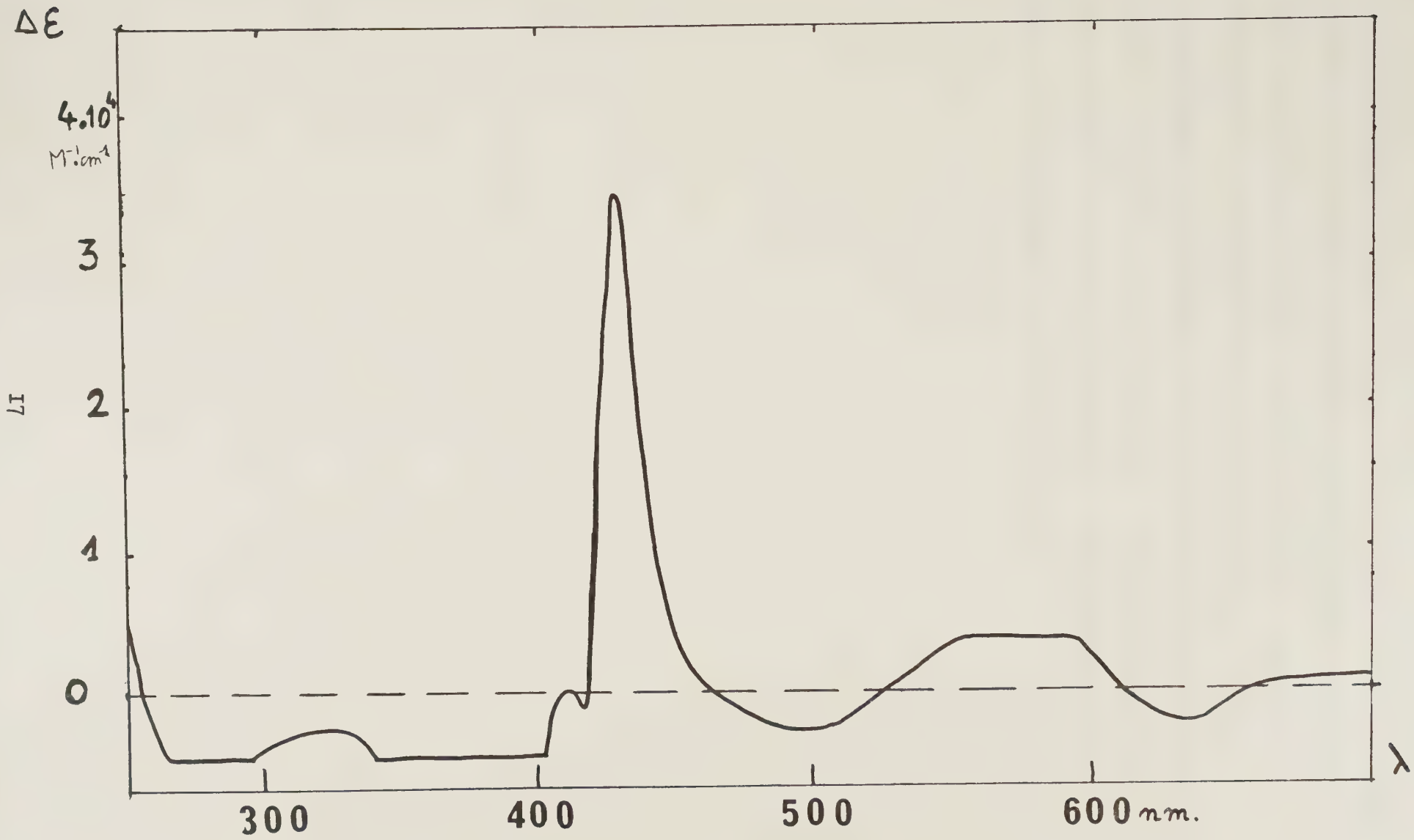


fig. 8 Spectre de méthémoglobine irradiée avec une dose de $0,426.10^{18}$ eV/cm^3
(Fe^{III} = $3,9.10^{-5}$ hème, référence méthémoglobine non irradiée)

La mesure des densités optiques des solutions a été faite en prenant la solution non irradiée comme référence.Ceci permettait d'obtenir directement la contribution en densité optique de l'espèce qui apparaissait.La connaissance des points isobestiques entre la méthémoglobine et l'oxyhémoglobine nous a permis de constater que la disparition de Fe^{III} conduisait directement à HbO_2,sans passer par l'intermédiaire de Hb.Dans nos conditions expérimentales,l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine était négligeable.

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX.

I)IRRADIATION γ.

A)Réduction de la méthémoglobine.

Lorsque la méthémoglobine en solution 0,I6 M en ions formiate est irradiée en présence d'air,elle se transforme progressivement en oxyhémoglobine.

En effet,on observe à 430 nm un accroissement de la densité optique alors qu'aucun changement n'intervient aux points isobestiques.

La figure 9 est une courbe typique qui montre l'apparition d'oxyhémoglobine dans les solutions de méthémoglobine($(Fe^{III})_o = 9,4.10^{-6}$ Mhème) en fonction de la dose.Aprés une montée cette courbe aboutit à un palier dont la valeur correspond à environ un quart de la concentration totale en hémoprotéine et ceci quelle que soit la concentration entre $9,4.10^{-6}$ et $3,I.10^{-4}$ Mhème,domaine pour lequel des courbes analogues ont été tracées (figure I0).

B)Rendements initiaux de réduction.

La tangente à l'origine permet de déterminer la valeur du rendement initial(figure 9).La courbe **11** donne la variation de ce rendement en fonction de la concentration en méthémoglobine. Lorsque cette concentration en protéine est supérieure à $2,4.10^{-4}$Mhème, cette courbe tend vers un palier correspondant à un rendement maximal de 6 molécules/I00eV. Ceci montre bien que la totalité des

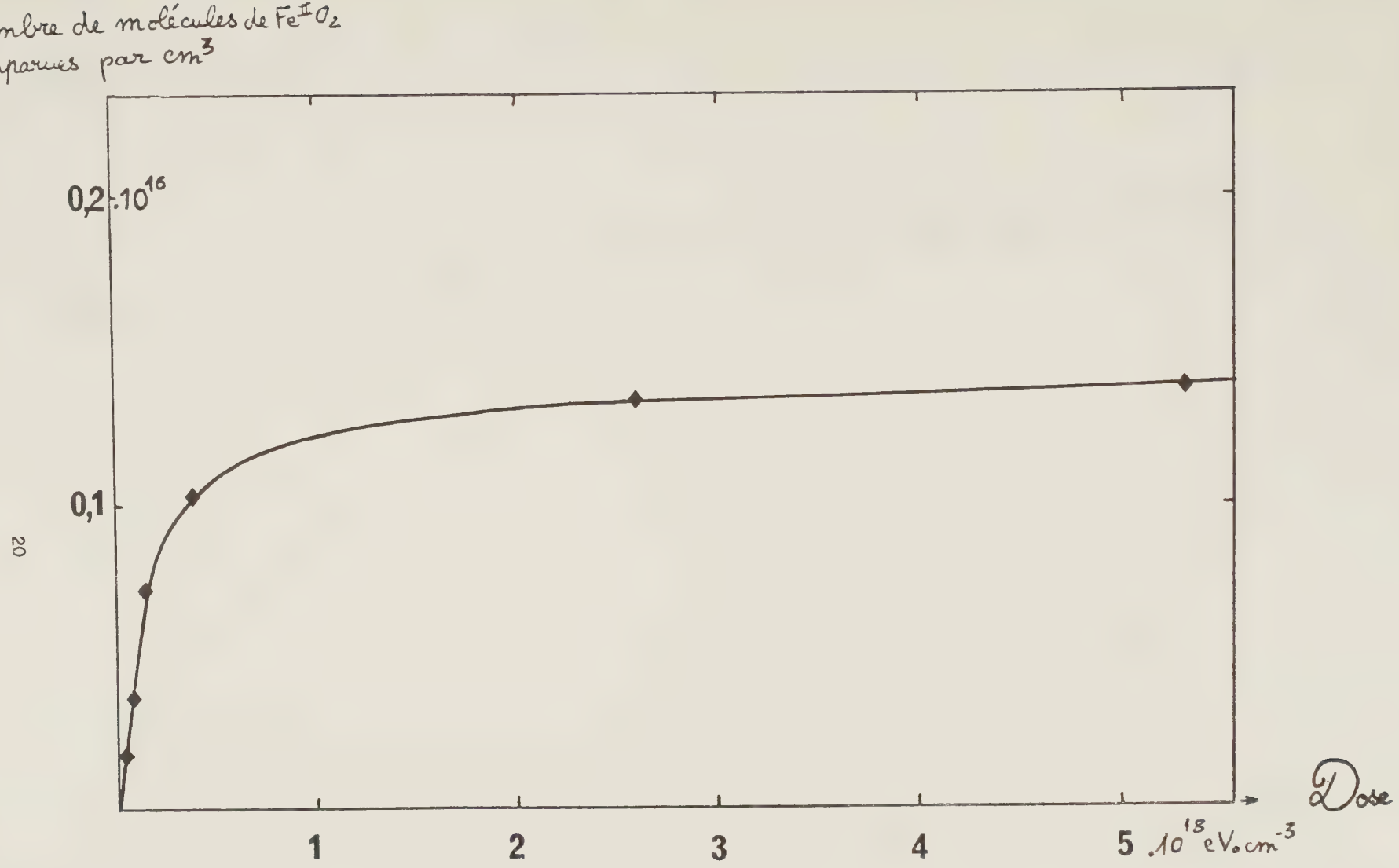


fig. 9 Formation d'oxyhémoglobine par irradiation γ ($(\overline{Fe})$= 9,4.10^{-6}Mhème)

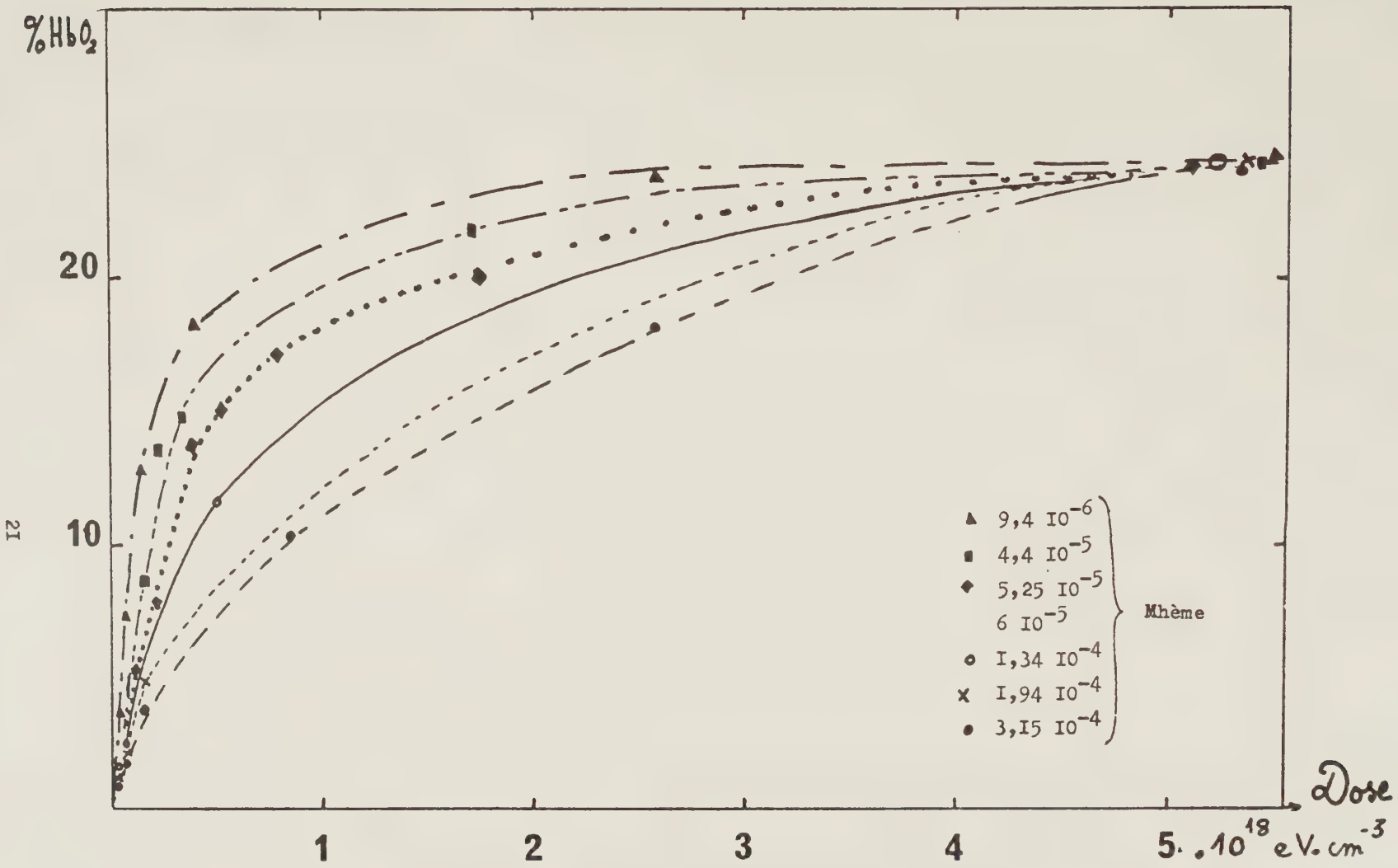


fig. I0 Pourcentage d'oxyhémoglobine apparue dans des solutions de méthémoglobine, en fonction de la dose d'irradiation γ.

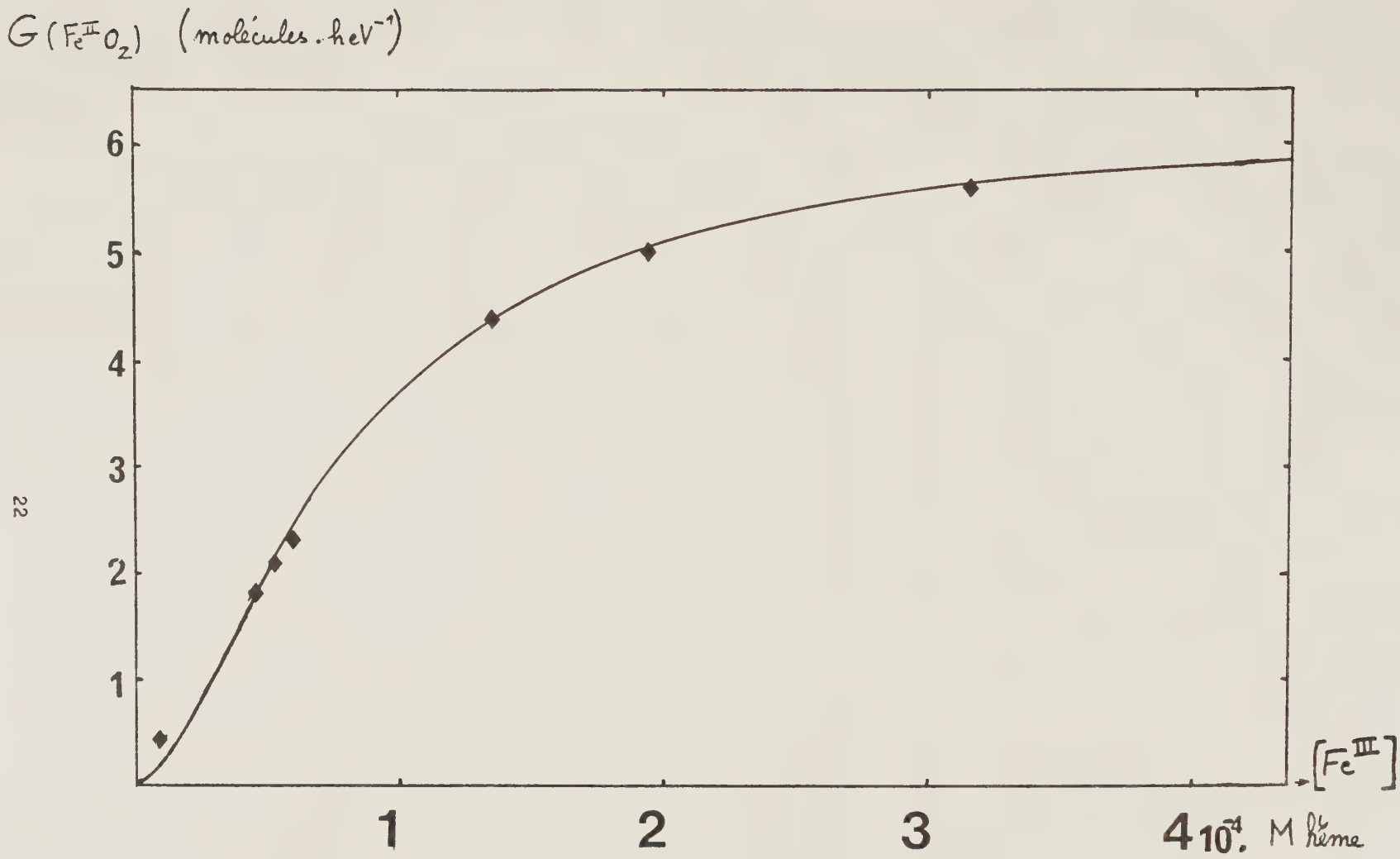


fig. II Rendement de formation d'oxyhémoglobine $G(Fe^{II}O_2)$ en fonction de la concentration en méthémoglobine(♦ points expérimentaux, — courbe théorique).

ions superoxyde a été utilisée pour la réduction($G_{O_2^-} = G_H + G_{OH} + G_{e_{aq}}$). La diminution du rendement pour les faibles concentrations peut être attribuée à la compétition avec la réaction de dismutation des ions O_2^-. A ce pH(7,8), celle ci se produit sous la forme:

$$O_2^- + HO_2 \longrightarrow HO_2^- + O_2,$$

la constante de cette réaction ayant été trouvée égale à $k_1 = 8,5.10^7\ M^{-1}.s^{-1}$ (21). Afin de rendre compte de la concentration relative des espèces O_2^- et HO_2, sa vitesse s'écrit: $k_1(O_2^-)^2 . 10^{pK-pH}$

$$HO_2 \rightleftharpoons O_2^- + H^+ \qquad pK = 4,8 \quad (40)$$

Pour interpréter quantitativement la courbe de dilution, le calcul montre qu'il faut admettre pour la constante k de la réaction:

$$Fe^{III} + O_2^- \longrightarrow Fe^{II}O_2,$$

la valeur suivante: $k = 4,6.10^2\ M^{-1}.s^{-1}$.

C) Irradiation de l'oxyhémoglobine.

Nous avons vu que les courbes traduisant l'évolution des solutions de méthémoglobine en fonction de la dose conduisent à une réduction maximale d'environ 25% pour toutes les concentrations. L'existence de ce palier fait donc penser à l'apparition d'une réaction inverse d'oxydation de l'oxyhémoglobine par les ions superoxyde, au fur et à mesure que celle ci s'accumule, la constante k' de cette réaction étant dans un rapport trois avec celle de la réaction

précédente.

Afin de vérifier cette hypothése nous avons irradié des solutions d'oxyhémoglobine(4 10^{-5} Mhème) en milieu formiate(0,16 M).

Pour les irradiations dont la durée n'excède pas 5 minutes (I=5 10^{18} eV.cm^{-3}.h^{-1}),aucun changement de densité optique n'est observé à 430 nm,la mesure des solutions étant faite immédiatement aprés la fin de l'irradiation.Ceci montre,contrairement à l'hypothèse précédente,que les ions superoxyde ne conduisent pas à une oxydation de l'oxyhémoglobine mais que,pour les intensités utilisées,ils se dismutent plus rapidement.On peut donc admettre que la constante de vitesse k' est en tout cas inférieure à 12 $M^{-1}.s^{-1}$.

Pour des durées d'irradiation plus longues,une légère oxydation est observée.Cette oxydation peut être attribuée à l'eau oxygénée formée dans le milieu à la fois avec le rendement moléculaire G= 0,7 molécule /100 eV et suivant la réaction de dismutation des ions superoxyde.

Cette action de l'eau oxygénée se poursuit dans tous les cas aprés la fin de l'irradiation.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une action de l'eau oxygénée sur l'oxyhémoglobine,nous avons comparé(figure 12) l'évolution de deux solutions.

α) Une première solution 1,25.10^{-5} Mhème était irradiée pendant 10 minutes avec un débit de dose de 5,6.10^{18} eV.$cm^{-3}.h^{-1}$.

β) La deuxième solution contenait initialement une concentration d'eau oxygénée égale à 0,61.10^{-4} M. :cette concentration correspondait à la production d'eau oxygénée dans une solution d'ions formiate au cours d'une irradiation dans les conditions précédentes.

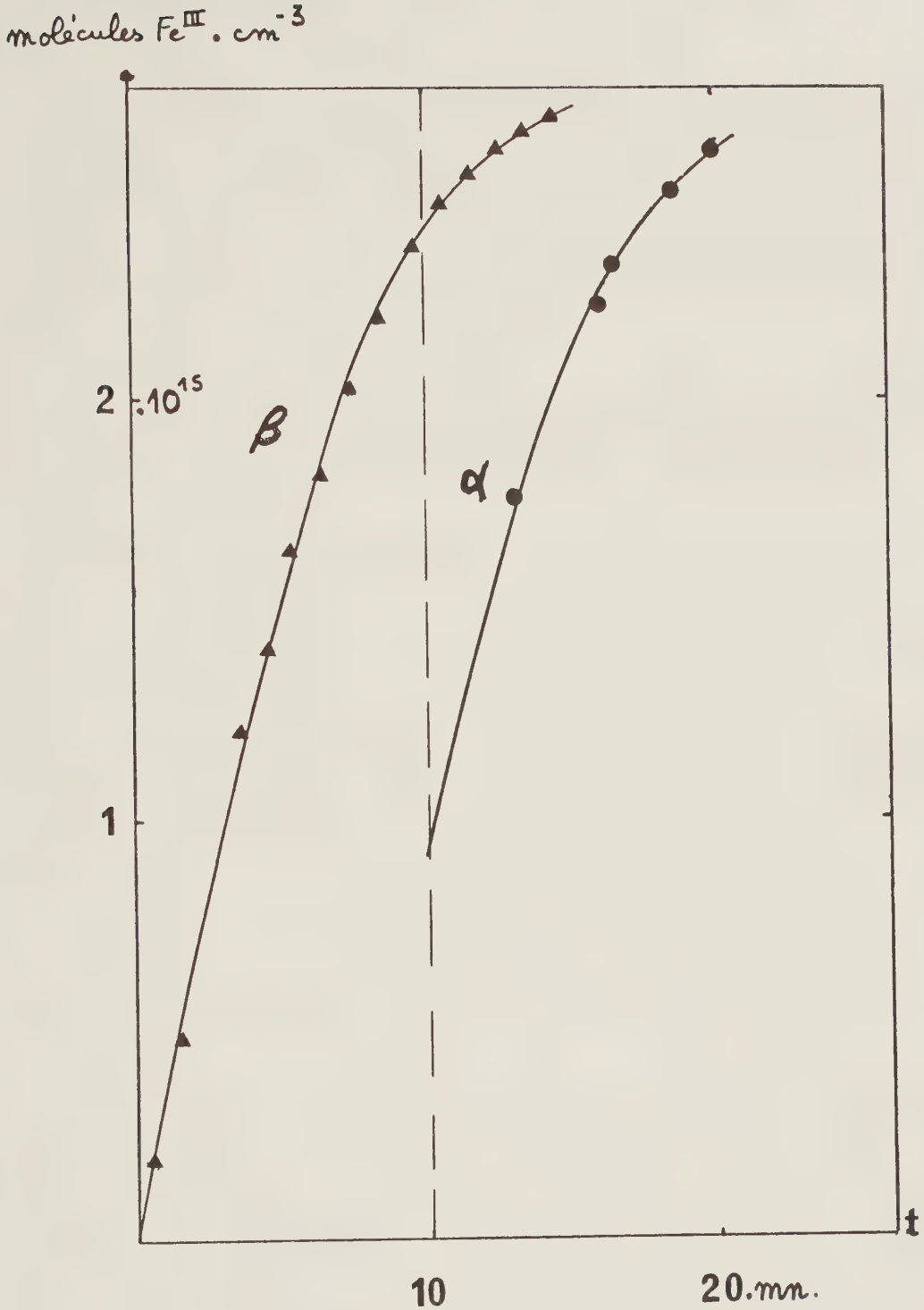


fig. I2 Comparaison de l'action de l'eau oxygénée et de l'effet prolongé pour les irradiations γ ;

β) $(Fe^{II}O_2) = 1{,}25.10^{-5}$ Mhème , $(H_2O_2) = 0{,}6.10^{-4}$ M..

α) $(Fe^{II}O_2) = 1{,}25.10^{-5}$ Mhème , t=10 mn. , I= $5{,}6.10^{18}$ eV.$cm^{-3}.h^{-1}$..

Le rendement de production d'H_2O_2 était dans ce cas égal à 3,7 molécules/100 eV : $\left[G(H_2O_2) = G_{H_2O_2} + 1/2\ (G_H + G_{e_{aq}} + G_{OH})\right]$

Les deux courbes étant semblables, on peut en déduire que l'action prolongée est bien due à l'action de l'eau oxygénée. La tangente à l'origine de la courbe β permet de calculer la valeur de la constante de vitesse de la réaction d'oxydation de l'oxyhémoglobine par H_2O_2 : $k'' = 1{,}5\ M^{-1}.s^{-1}$.

Pour ce calcul, nous avons tenu compte du fait qu'en milieu formiate, l'eau oxygénée oxyde deux fois l'oxyhémoglobine:

$$H_2O_2 + Fe^{II}O_2 \longrightarrow Fe^{III} + OH + OH^- + O_2$$

$$OH + HCOO^- \longrightarrow H_2O + COO^- .$$

En conclusion, cette série d'expériences montre que l'oxydation du Fe^{II} par O_2^- n'a pas lieu dans ces conditions et que le palier ne peut être dû à l'oxydation inverse.

II) RADIOLYSE PULSEE .

Avec les doses obtenues, en une impulsion, au Febetron 707 ($\simeq$ 20 krad), les concentrations en O_2^- dans le milieu formiate sont de l'ordre de 10^{-4} M. Etant donnés les résultats obtenus en radiolyse γ et la valeur des constantes k et k', on peut penser que l'on n'observera en radiolyse pulsée ni la réduction de la méthémoglobine ni l'oxydation de l'oxyhémoglobine. En effet, ces réactions ne pourraient entrer en compétition avec la dismutation des radicaux O_2^-.

A)Irradiation d'oxyhémoglobine.

Nous avons irradié une solution de 3.10^{-5}Mhème en oxyhémoglobine en essayant de suivre par absorption à 430 nm une éventuelle oxydation.Dans ces conditions, aucune réaction n'avait lieu pour des temps allant de 10^{-5} à 5 secondes,aussi bien à 430 nm qu'aux points isobestiques(475 et 525 nm).Ceci confirme les résultats obtenus par ailleurs en radiolyse γ.Les ions superoxyde ne réagissent pas sur l'oxyhémoglobine en concentration insuffisante pour entrer en compétition avec la réaction de dismutation.

B)Réduction de la méthémoglobine.

En irradiant des solutions $3,5.10^{-5}$ Mhème en méthémoglobine, aucune variation sensible dans la densité optique à 430 nm n'est observée pour des temps de l'ordre de quelques centaines de millisecondes . Dans ces laps de temps,la plupart des radicaux O_2^- disparaissent ne serait-ce que par dismutation spontanée.La décroissance des ions superoxyde ne peut malheureusement être suivie en présence de méthémoglobine par suite de l'absorption propre de celle-ci à 245 nm.Mais il est visible (figure I3) que même en absence de Fe^{III},par suite de la seule dismutation,la décroissance de ce radical s'effectue bien en quelques centaines de millisecondes.

Cependant pour des temps plus longs,de l'ordre de quelques secondes,on constate un accroissement de l'absorption à 430 nm(figure I4).Cette augmentation de densité optique est due à l'apparition d'oxyhémoglobine,l'absorption aux points isobestiques restant inchangée.La réduction obtenue n'est pas totale(Tableau III),elle

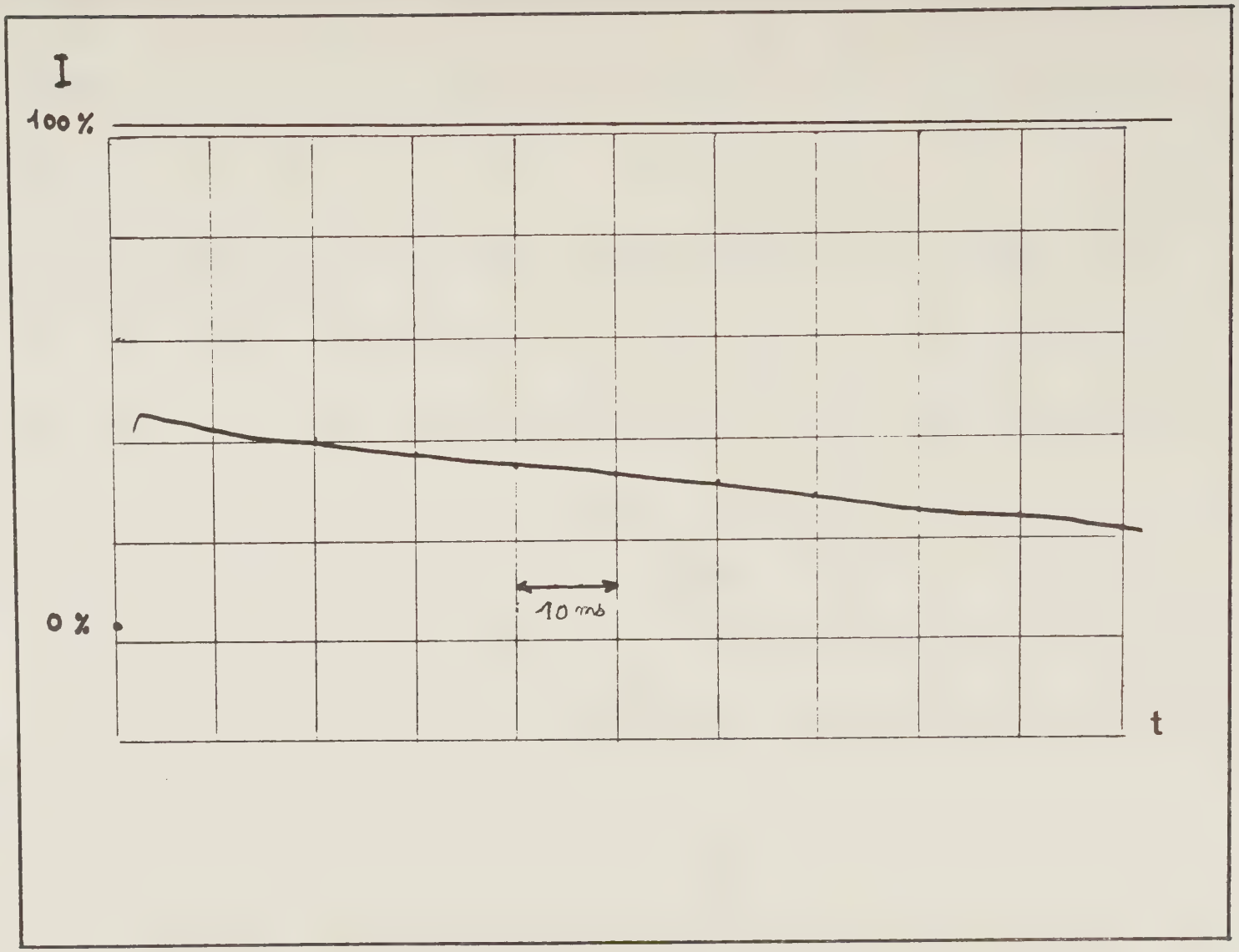


fig. I3 Cliché de l'évolution de l'ion superoxyde O_2^- en radiolyse pulsée;
(tampon phosphate:pH= 7,65;($HCOO^-$)= 0,I6M.;λ = 245 nm.).

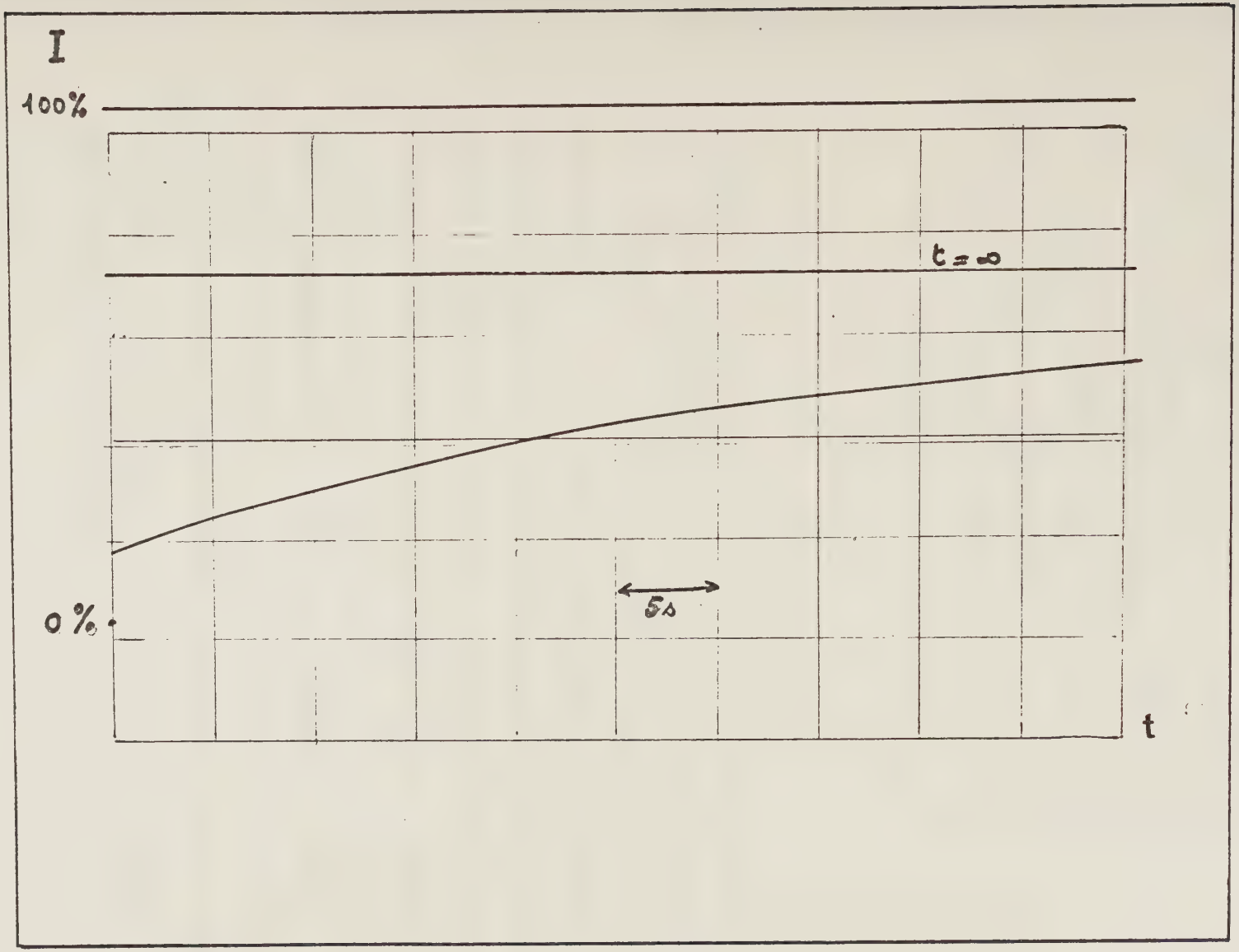


fig. I4 Cliché de l'apparition d'oxyhémoglobine par radiolyse pulsée (tampon phosphate: pH= 7,8 ; $(HCOO^-)$= 0,I6 M. ; (Fe^{III})= 3,5.$I0^{-5}$ Mhème (O_2^-)= I,29.$I0^{-4}$ M. ; λ=430 nm.).

DOSE Krad	O_2^- M.	$Fe^{III}O_2^-$ Mhème.
I5,36	$0,82.10^{-4}$	$8,8.10^{-6}$
23,I2	$I,29.10^{-4}$	$5,6.10^{-6}$

TABLEAU III

aboutit à un palier,palier d'autant plus bas que la dose est importante. Etant donné le délai écoulé entre la disparition des radicaux O_2^- et l'apparition de l'oxyhémoglobine,on est conduit à admettre que la réduction de la méthémoglobine s'effectue par l'intermédiaire de la formation d'un complexe que nous écrirons $Fe^{III}O_2^-$.La décroissance de ce complexe conduirait à la formation d'oxyhémoglobine.La courbe de la figure I5 donnant la variation de $Log(log(\frac{I}{I_\infty}))$ en fonction du temps est une droite,ce qui est caractéristique d'une décroissance du premier ordre.La pente de cette droite indique la valeur de la constante cinétique de cette décroissance: $k = I,5.10^{-2}\ s^{-I}$.

Remarquons toutefois que l'existence d'un tel complexe a déjà été invoquée par ailleurs lors de l'étude de l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine (4I)(42).

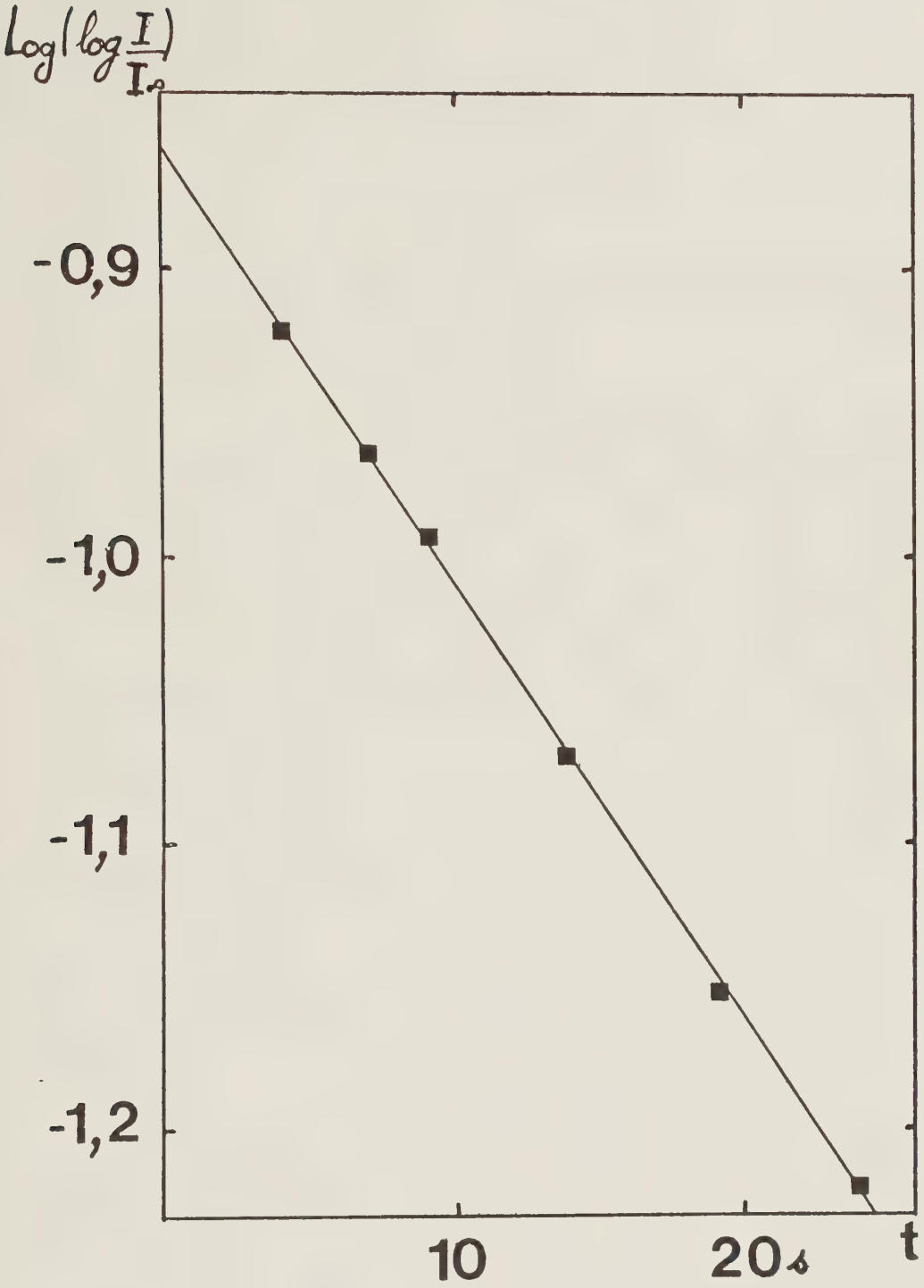


fig. 15 Cinétique du premier ordre pour la décroissance du complexe $Fe^{III}O_2^-$

((Fe^{III})= 3,5.10^{-5}Mhème; (O_2^-)= 1,29.10^{-4}M.; pH= 7,8)

CHAPITRE IV

INTERPRETATION.

D'après l'ensemble de nos résultats,l'interprétation doit donc tenir compte des faits suivants:

-La compétition déterminant l'influence de la concentration sur le rendement initial de la réduction ne doit pas être due à une dismutation des ions superoxyde ,car celle-ci aurait supprimé toute possibilité de réduction lors de notre étude de radiolyse pulsée.

-Le palier auquel on aboutit lors des irradiations prolongées de méthémoglobine en radiolyse γ n'est dû ni à une oxydation inverse de l'oxyhémoglobine par les radicaux O_2^- ni à une action de l'eau oxygénée produite au cours de l'irradiation,du fait de la faible valeur de la constante de vitesse ($k = 1{,}5\ M^{-I}.s^{-I}$).

-L'existence d'un intermédiaire du type $Fe^{III}O_2^-$ doit être supposée au cours de la réduction de la méthémoglobine par les ions superoxyde.

Si on écrit les réactions possibles de disparition de ce complexe,on obtient le schéma cinétique suivant:

$$I)\ O_2^- + Fe^{III} \longrightarrow Fe^{III}O_2^- ,$$

$$2)\ Fe^{III}O_2^- \longrightarrow Fe^{II}O_2 ,$$

$$3)\ Fe^{III}O_2^- + O_2^- \xrightarrow{2\,H^+} Fe^{III} + H_2O_2 + O_2 ,$$

$$4)\ Fe^{III}O_2^- + Fe^{III} \longrightarrow Fe^{III} + Fe^{II}O_2 \ ,$$

$$5)\ Fe^{III}O_2^- + Fe^{II}O_2 \xrightarrow{2H^+} 2\,Fe^{III} + H_2O_2 + O_2 .$$

Signalons ici que les deux dernières réactions ne sont pas forcément des réactions intermoléculaires mais qu'elles peuvent intervenir au sein du tétramère.

I)L'apparition de l'oxyhémoglobine par radiolyse pulsée serait due aux réactions 2 et 4.Le fait que la réduction ne soit pas totale s'explique par la compétition entre les réactions I et 3 lors de la formation du complexe et par l'intervention de la réaction 5 à la fin de la décroissance de celui-ci.

2)La réduction initiale par radiolyse γ résulte des réactions I-2-3-4,la réaction I serait dans ce cas plus rapide que la réaction de dismutation des ions superoxyde .La compétition entre la formation de l'oxyhémoglobine(2 et 4) et la réaction 3 est responsable de l'effet de concentration.

Le calcul cinétique utilisant ce schéma et basé sur les équations d'états quasi-stationnaires en H,OH,e_{aq}, COO^-,puis en O_2^- et $Fe^{III}O_2^-$ conduit aux équations suivantes:

$$\frac{d(Fe^{III}O_2^-)}{dt} = k_I(Fe^{III})(O_2^-) - k_2(Fe^{II}O_2^-) - k_3(Fe^{III}O_2^-)(O_2^-) - k_4(Fe^{III})(Fe^{III}O_2^-) = 0 \ ,$$

$$\frac{d(O_2^-)}{dt} = G_R I - \left[k_I(Fe^{III}) + k_3(Fe^{III}O_2^-)\right](O_2^-) = 0 \ ,$$

$$\frac{d(Fe^{II}O_2)}{dt} = G_o\dot{I} = (Fe^{III}O_2^-)\left[k_2 + k_4(Fe^{II})\right],$$

où G_o désigne le rendement initial en oxyhémoglobine mesuré et G_R la somme des rendements radicalaires ($G_{OH} + G_H + G_{e_{aq}}$) conduisant à la production des ions O_2^-, $\dot{I}$ étant le débit de dose.

En éliminant (O_2^-) et $(Fe^{III}O_2^-)$, on obtient une équation qui peut être mise sous la forme :

$$Y = \frac{G_o\dot{I}}{(Fe^{III})}\left(1 + \frac{2\,G_o}{G_R - G_o}\right) = \frac{k_I}{k_3}\left[k_4(Fe^{III}) + k_2\right]$$

On voit sur la courbe I6 que la variation de Y en fonction de (Fe^{III}) est bien une droite. En effet la méthode des moindres carrés fournit un indice de corrélation linéaire égal à 0,996. La valeur de la pente est :

$$\frac{k_I.k_4}{k_3} = 4{,}3\ M^{-I}.\ s^{-I}.$$

La valeur de l'ordonnée à l'origine, compte-tenu de l'imprécision due à l'extrapolation permet d'estimer :

$$\frac{k_I.k_2}{k_3} \simeq 1{,}8.10^{-5}\ s^{-I}.$$

On voit que, pour l'ensemble de ces expériences, l'apparition de l'oxyhémoglobine est due surtout à la réaction 4, et non à la réaction 2.

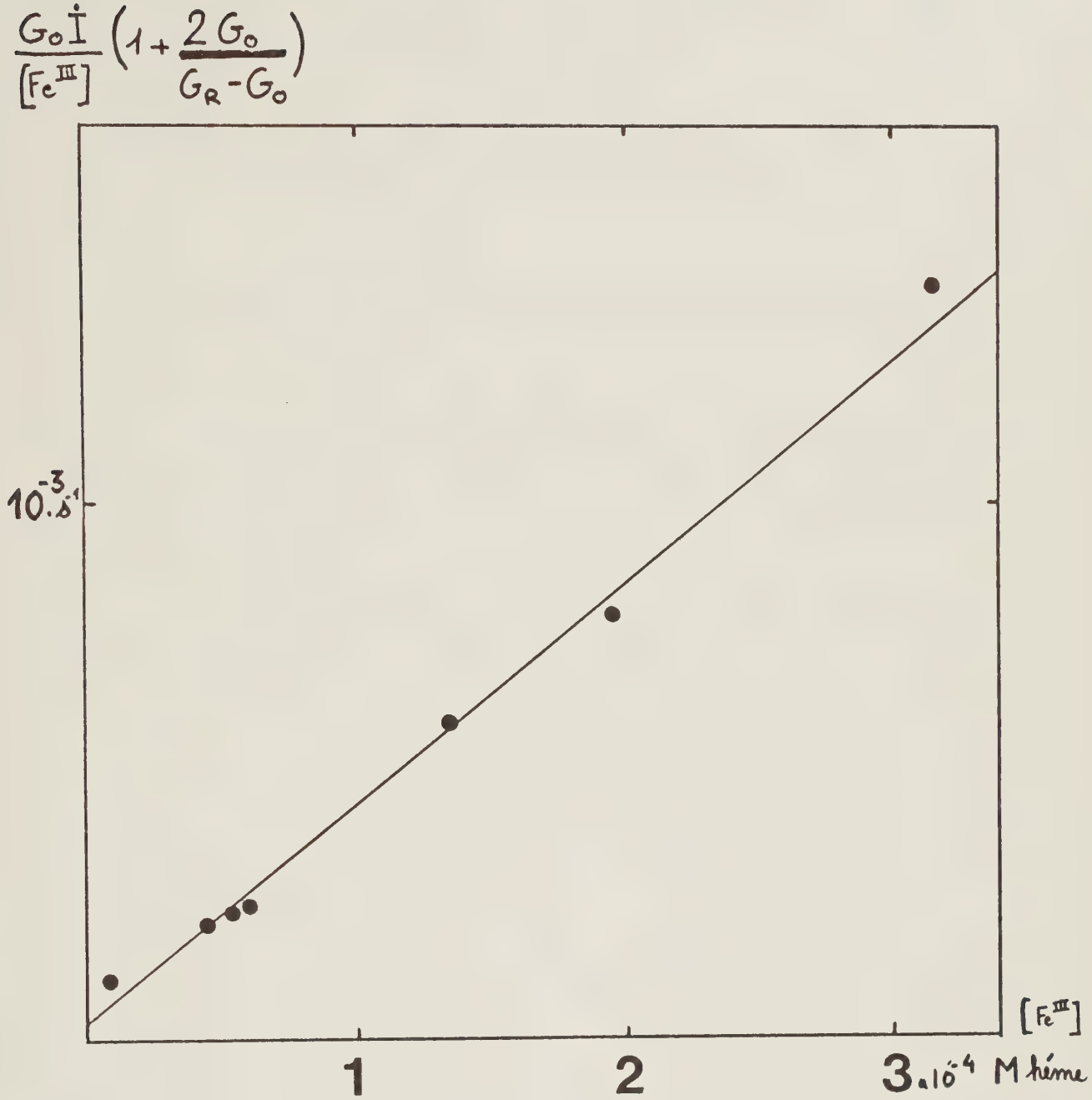


fig. I6 Interprétation de la courbe de dilution:détermination du rapport $k_1.k_4/k_3$ (points expérimentaux correspondant à la figure II)

3)Lorsque la prolongation des irradiations γ aboutit aux plus fortes doses,l'intervention de la réaction inverse 5 conduit à un palier dont la hauteur est définie par:

$$\frac{d(Fe^{II}O_2)}{dt} = k_4(Fe^{III}O_2^-)(Fe^{I}) - k_5(Fe^{III}O_2^-)(Fe^{II}O_2) = 0.$$

D'aprés la valeur du palier (25%) on est amené à admettre:

$$k_5 \# 3\ k_4 .$$

A partir des valeurs ainsi calculées,il est possible de connaitre la fonction $G_o = f(Fe^{III})$.Sur la figure 11,la courbe théorique correspond bien aux points expérimentaux.

Le schéma proposé suffit donc à interpréter les résultats, tant en radiolyse γ qu'en radiolyse pulsée.

CHAPITRE V.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Notre travail expérimental était terminé lorsqu'est paru un article de H.C.SUTTON et al,(43) sur la vitesse de réaction des ions superoxyde sur l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine.Ces auteurs ont employé des méthodes analogues aux nôtres tant en radiolyse γ qu'en radiolyse pulsée.Ils ont utilisé de plus la méthode enzymatique de production de O_2^- par le système xanthine-xanthine oxydase(44).

Contrairement à nous,ces auteurs n'ont observé en radiolyse pulsée ni réduction de la méthémoglobine ni oxydation de l'oxyhémoglobine.Aucun détail n'est fourni concernant les temps d'observation mais il est fort probable que,étant données leurs hypothèses de travail,ceux-ci étaient nettement inférieurs aux temps de transformation du complexe $Fe^{III}O_2^-$ en oxyhémoglobine.

De plus,ces auteurs ont constaté,lors de la radiolyse γ en présence d'ions formiate ,une oxydation immédiate de l'oxyhémoglobine. Cette apparition de méthémoglobine ne pouvait être due à une action de l'eau oxygénée sur l'oxyhémoglobine puisqu'ils opéraient en la présence de catalase,enzyme qui devait catalyser la réaction:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2\ H_2O + O_2 \bullet$$

Remarquons cependant que, contrairement à nos expériences, les solutions d'oxyhémoglobine étudiées par ces auteurs comportaient toujours de l'ordre de 10% de méthémoglobine. Or, d'après nos hypothèses, ceci devrait suffire à expliquer l'apparition de méthémoglobine par l'intermédiaire du complexe $Fe^{II}O_2^-$ selon la réaction 5:

$$Fe^{III}O_2^- + Fe^{II}O_2 \xrightarrow{2\,H^+} 2\,Fe^{III} + H_2O_2 + O_2 \quad ,$$

le complexe étant formé par action des ions superoxyde sur la méthémoglobine (réaction I).

De plus, il n'est pas impossible que la catalase joue dans ce cas un rôle de peroxydase catalysant, pendant l'irradiation même, l'oxydation de l'oxyhémoglobine par l'eau oxygénée.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons irradié des solutions d'oxyhémoglobine ($I,8.10^{-5}$ Mhème) contenant de la catalase (3.10^{-8}M.). Nous avons effectivement constaté une légère oxydation qui ne se poursuivait pas après la fin de l'irradiation.

Il semble donc que les conclusions de ces auteurs ne sont qu'apparemment en contradiction avec notre tavail et que les interprétations que nous avons précédemment développées restent valables.

Nous avons l'intention de poursuivre ultérieurement ces recherches, notamment dans les directions suivantes:

1) Déterminer l'influence de la concentration en méthémoglobine sur une éventuelle oxydation de l'oxyhémoglobine par O_2^-, oxydation pouvant conduire aux paliers observés lors de la réduction.

2) Préciser le mécanisme de peroxydase joué par la cata-

lase,en particulier en faisant varier les concentrations relatives en catalase et en eau oxygénée.

3)Caractériser le complexe intermédiaire,par radiolyse pulsée,tant du point de vue spectrophotométrique que cinétique.

4)Etendre cette étude concernant les réactions du radical O_2^- à d'autres systèmes oxydo-réducteurs d'intéret biologique.

Ce travail montre l'existence d'un équilibre entre l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine:

$$Fe^{II}O_2 \rightleftharpoons Fe^{III} + O_2^- \ ,$$

puisque la réaction inverse de réduction de la méthéglobine par les ions O_2^- a été mise en évidence,alors qu'aucune oxydation de l'oxyhémoglobine par les ions superoxyde n'a été observée.La réaction d'auto-oxydation de $Fe^{II}O_2$ n'est donc pas autocatalysée par ce radical.

Etant donné cet équilibre,il semble que le système puisse favoriser les oxydations par O_2 dans certains stades biologiques et ceci par deux voies différentes:

- la première,par la production de méthémoglobine due à une consommation des ions superoxyde O_2^- (par exemple par des superoxyde dismutases toujours présentes dans les globules rouges),consommation qui déplace l'équilibre.Cette méthémoglobine oxyde le NADH en NAD^+ qui induit une chaîne d'oxydation ultérieure.

- la seconde,par le rôle de donneur de O_2^- joué par le système, En effet,l'équilibre fournit un état stationnaire qui peut favoriser une chaîne d'oxydation du type:

$$O_2^- + AH_2 \xrightarrow{H^+} AH + H_2O_2 \ ,$$

$$O_2 + AH \longrightarrow A + O_2^- + H^+ .$$

L'étude de l'action de ces ions superoxyde sur divers systèmes d'intérêt biologique,est donc intéressante.Cette étude peut être menée conjointement en radiolyse pulsée et en radiolyse γ ,leur complémentarité pouvant être fructueuse,comme ce travail l'a montré.

BIBLIOGRAPHIE

I) J.M.Mc Cord,I Fridovich, J.Biol;Chem:,244,6049(I969)

2) I.Fridovich, Account.Chem.Res,5,32I(I972)

3) K.Kovacs,B.Matkovics, Enzyme,20,I(I975)

4) J.M.Mc Cord,B.B.Keele,I.Fridovich, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68,I024(I97I)

5) R.A.Weisiger,I.Fridovich, J.Biol.Chem,248,I0,3582(I973)

6) G.Rotilio,R.C.Bray,M.Fielden, Biochem.Biophys.Acta 268,60I(I972)

7) H.P.Misra,I.Fridovich, J.Biol.Chem,247,2I,6960(I972)

8) O.Augusto,G.Cilento, Arch.Biochem.Biophys,I68,549(I975)

9) W.S.Caughey,C.H.Barlow,J.C.Maxwell,J.A.Volpe,W.J.Wallace, Ann.N.Y.Acad.Sci,244,I(I975)

I0) C.H.Barlow,J.C.Maxwell,W.J.Wallace,W.S.Caughey,Biochem. Biophys.Res.Comm,55,9I(I973)

II) J.Kruh ,Biochimie,Etudes médicales et biologiques,p I49 Hermann Ed(I97I)

I2) F.Chapeville,H.Clauser et al, Biochimie,p 666 ,Hermann Ed(I974)

I3) F.Haurowitz,R.Hardin, The Proteins,vol II,part A,296,Académic Press New York(I954)

I4) A.L.Lehninger, Biochimie,p I83,6éme ed,Flammarion Médecine Science(I973)

I5) C.Bull,B.M.Hoffman, Nat.Acad.Sci.USA,72,9,3382(I975)

I6) F.Kuma,R.A.Prough,B.S.S.Master, Arch.Biochem.Biophys,I72,600 (I970)

I7) F.Kuma,S.Ishizawa,K.Hiroyama,H.Nakajima, J.Biol.Chem,247,550, (I972)

I8) F.Kuma,H.Inomata, J.Biol.Chem,247,556,(I972)

I9) W.D.Wright, Nature,I96,4887,I239,(I963)

20) S.Green,A.Mazur,E.Shorr, J.Biol.Chem,220,237,(I956)

2I) D.Behar,C.Czapski,L.M.Dorfmann,J.Rabani,H.A.Schwarz,J.Phys.Chem, 74,3209,(I956)

22) E.J.Hart, J.Phys.Chem,56,594,(I952)

23) J.P.Keene, Rad.Res,22,I,(I964)

24) S.Gordon,E.J.Hart,M.S.Matheson,J.Rabani,J.K.Thomas, J.Am.-Chem.Soc,85,I375,(I963)

25) M.S.Matheson,W.A.Mulac,J.L.Weeks.J.Rabani, J.Phys.Chem,70,-2092,(I966)

26) J.Rabani, J.Phys.Chem,66,36I,(I962)

27) J.Rabani,D.Meyerstein, J.Phys.Chem,72,I599,(I968)

28) G.E.Adams,R.L.Wilson, Trans.Farad.Soc,65,298I,(I969)

29) R.Wever,B.Oudega,B.F.Van Gelder, Biochem.Biophys.Acta,302,-475,(I973)

30) G.Ingelfritz,T.M.Schuster, J.Biol.Chem,249,9,2959,(I974)

3I) J.V.Kilmartin, Biochem.J,I33,725,(I973)

32) W.J.Wallace,J.C.Maxwell,W.S.Caughey, Biochem.Biophys.Res.Commun,57,4,II04,(I974)

33) L.C.Dickinson,J.C.W.Chien, J.Am.Chem.Soc,97,I0,2620,(I975)

34) H.Wiskowska, Acta.Univ.Lodz, Folia.Biochem.Biophys,I,65,(I975)

35) Z.Sweda-Lewandowska,M.Puchała,W.Leyko, Rad.Res,65,50,(I976)

36) O.W.Van Assendelft,W.G.Zylstra, Anal.Biochem,69,43,(I975)

37) R.E.Benesch,R.Benesch,S.Yung, Anal.Biochem,55,245,(I973)

38) E.Antonini,M.Brunoni, Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands,p I9,North.Holland.Public.Co,Amsterdam and London,(I97I)

39) R.Benesch,R.E.Benesch, J.Biol.Chem,236,405,(I96I)

40) J.Rabani,S.O.Nielsen, J.Phys.Chem,73,3736,(I969)

41) R.E.Lynch,G.R.Lee,G.E.Cartwright, J.Biol.Chem,25I,4,I0I5, (I976)

42) J.B.Wittenberg,B.A.Wittenberg,J.Peisach,W.E.Blumberg, Proc. Nat.Acad.Sci.U.S.A,67,I846.(1970)

43) H.C.Sutton,P.B.Roberts,C.C.Winterbourn, Biochem.J,I55,503, (I976)

44) C.C.Winterbourn,B.H.Mc.Grath,R.W.Carrel, Biochem.J,I55,493, (I976)

SOMMAIRE

	Pages
CHAPITRE I	I
I INTRODUCTION.	I
II HEMOGLOBINE-OXYHEMOGLOBINE-METHEMOGLOBINE.	3
III RADIOLYSE DE L'EAU.	8
A)Effets primaires.	8
B)Action des solutés.	9
C)Production des ions superoxyde .	IO
CHAPITRE II - METHODES EXPERIMENTALES.	II
I PREPARATION DES SOLUTIONS DE METHEMOGLOBINE ET D'OXYHEMOGLOBINE.	II
II SOURCES D'IRRADIATION	I4
A)Irradiation gamma.	I4
B)Radiolyse pulsée.	I4
C)Dosage des solutions irradiées.	I5
CHAPITRE III - RESULTATS EXPERIMENTAUX.	I
I IRRADIATION GAMMA.	I9

A)Réduction de la méthémoglobine. I9

B)Rendements initiaux. I9

C)Irradiation de l'oxyhémoglobine. 23

II RADIOLYSE PULSEE. 26

A)Irradiation de l'oxyhémoglobine. 27

B)Réduction de la méthémoglobine. 27

CHAPITRE IV - INTERPRETATION. 32

CHAPITRE V - DISCUSSION ET CONCLUSION. 37

BIBLIOGRAPHIE 4I